คม 325 ชีวเคมี 2

เทคโนโลยีของลิปิด

บทที่ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพสำหรับสารกลุ่มไขมัน

อ.ดร. อนรรฆอร ศรีไสยเพชร

ความสำคัญ

- การเจริญเต็มที่ของวิทยาการทางปิโตรเคมี
- ความกดดันทางมลภาวะของสิ่งแวดล้อม

นำความรู้ในขบวนการทางชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในขบวนการทางอุตสาหกรรม

การใช้ตัวเร่งทางชีวภาพหรือเอนไซม์เป็นคะตะลิส

คุณสมบัติที่ดีของเอนไซม์

- เป็นคะตะลิสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงแม้เมื่ออยู่ในภาวะที่ไม่รุนแรง
- มีความจำเพาะสูงในการเร่งปฏิกิริยา
- สามารถนำกลับมาใช้ใหม่และมีความเสถียรดีขึ้น
- สลายตัวในธรรมชาติ ไม่ก่อสภาวะแวดล้อมเป็นพิษ (Biodegradable)
- สามารถปรับปรุง และเปลี่ยนแปลงให้มีคุณสมบัติที่ต้องการได้

ไลเปส (Lipase)

Lipase : Triacylglycerol acylhydrolases,

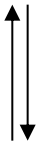
glycerol ester hydrolase (E.C.3.1.1.3)

- เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอร์ไรด์

$$TG + H_2O \xrightarrow{\text{Lipase}} FFA + DG + MG + \text{glycerol}$$

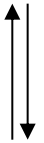
$$TG \xleftarrow{\text{Lipase}} FFA + \text{glycerol}$$

ไตรกลีเซอไรด์



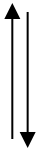
น้ำ

ไดกลีเซอไรด์ + กรดไขมัน



น้ำ

โมโนกลีเซอไรด์ + กรดไขมัน

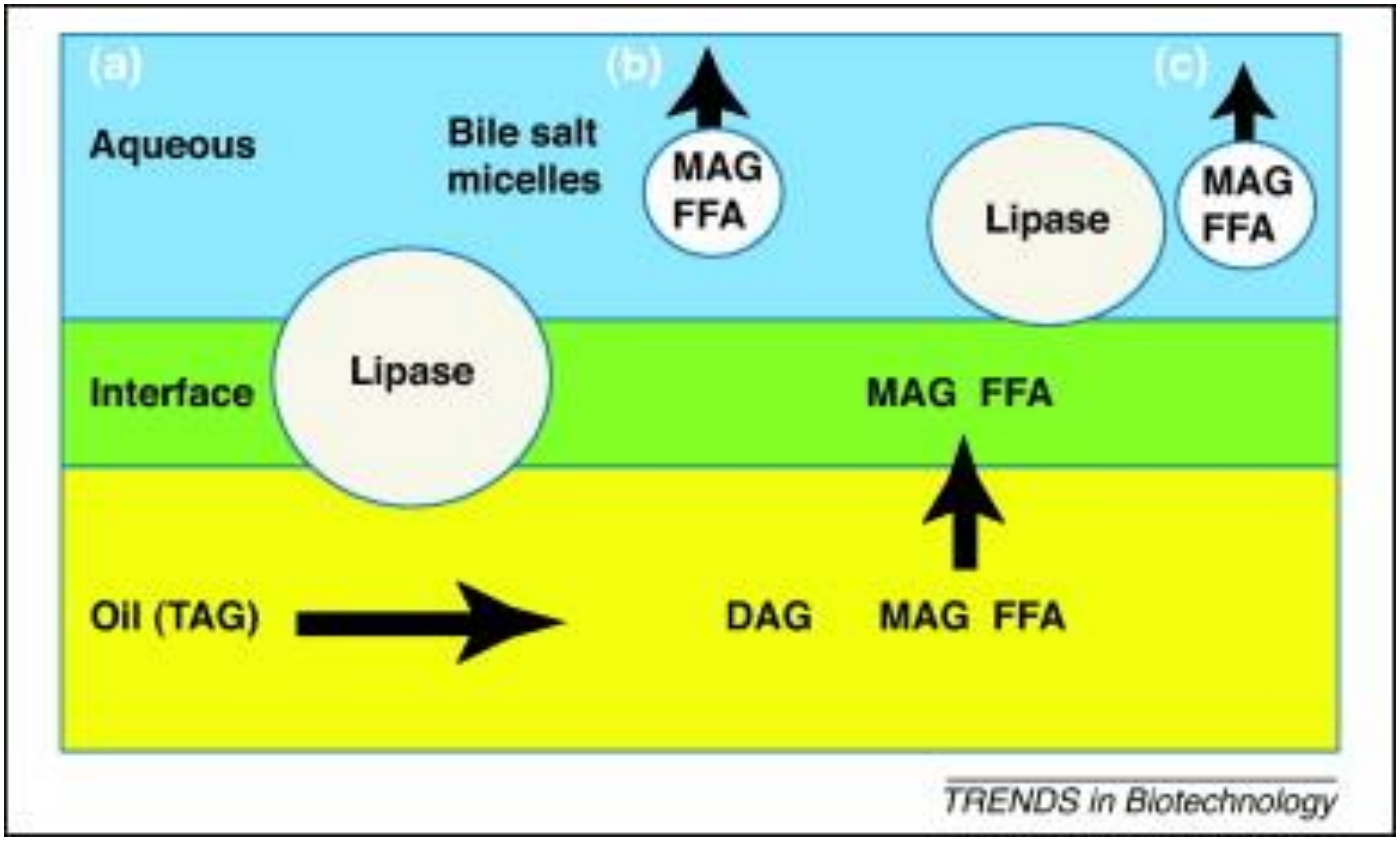


น้ำ

กลีเซอรอล + กรดไขมัน

ปฏิกิริยาการสลายและการสร้างไตรกลีเซอไรด์โดยไลเปส

ปฏิกิริยาเกิดขึ้นบริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นสับสเตรทกับชั้นน้ำ (Oil-water interface)



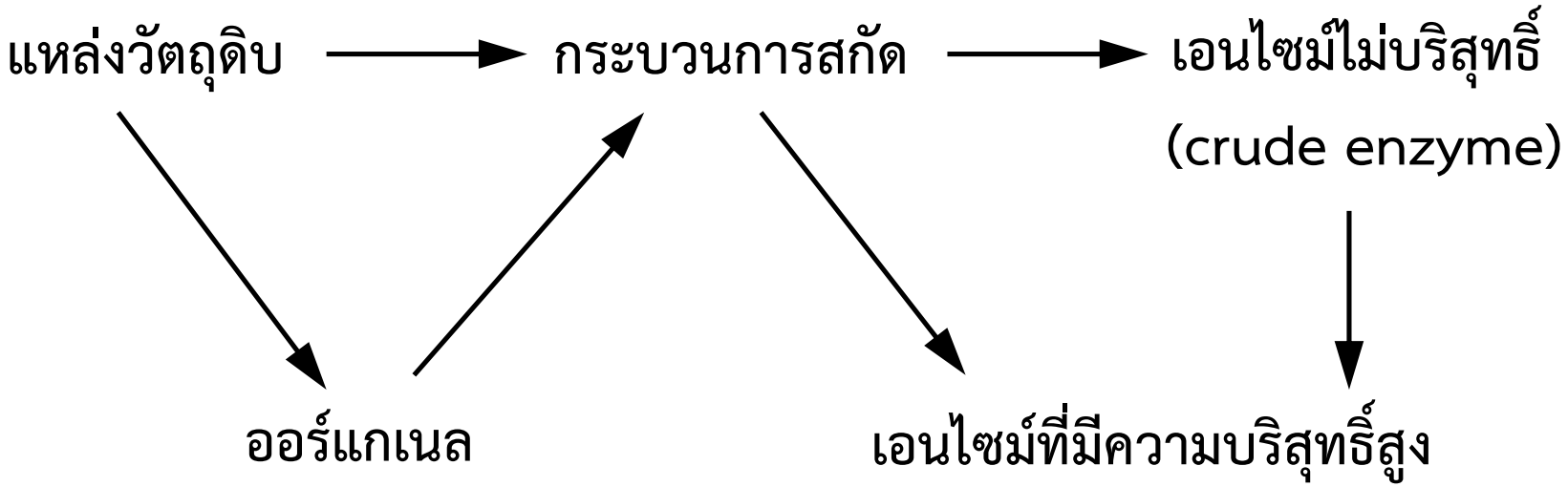
Sources

- Animals : pancreases
- Plants : Oat , soybean
- M/O : bacteria , fungi ,yeast

Specification of lipase on substrate

1. Specification to the position on triglyceride molecule (position specification)
2. Specification to fatty acid (fatty acid specification)

ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์



Action of lipases

1. Hydrolysis reaction

2. Synthesis

   - Esterification

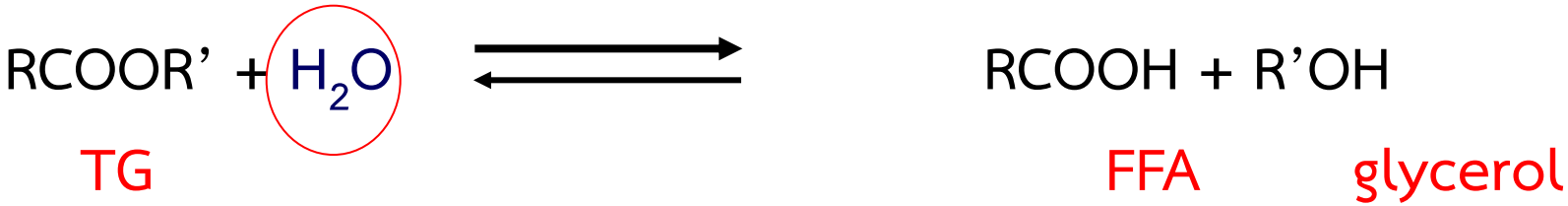
   - Interesterification

   - Alcoholysis

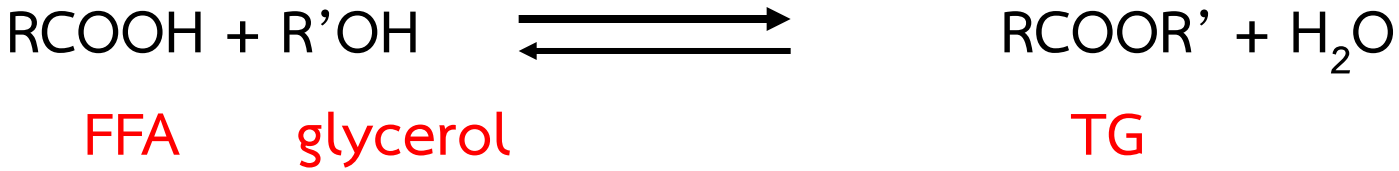
   - Acidolysis

Action of lipases

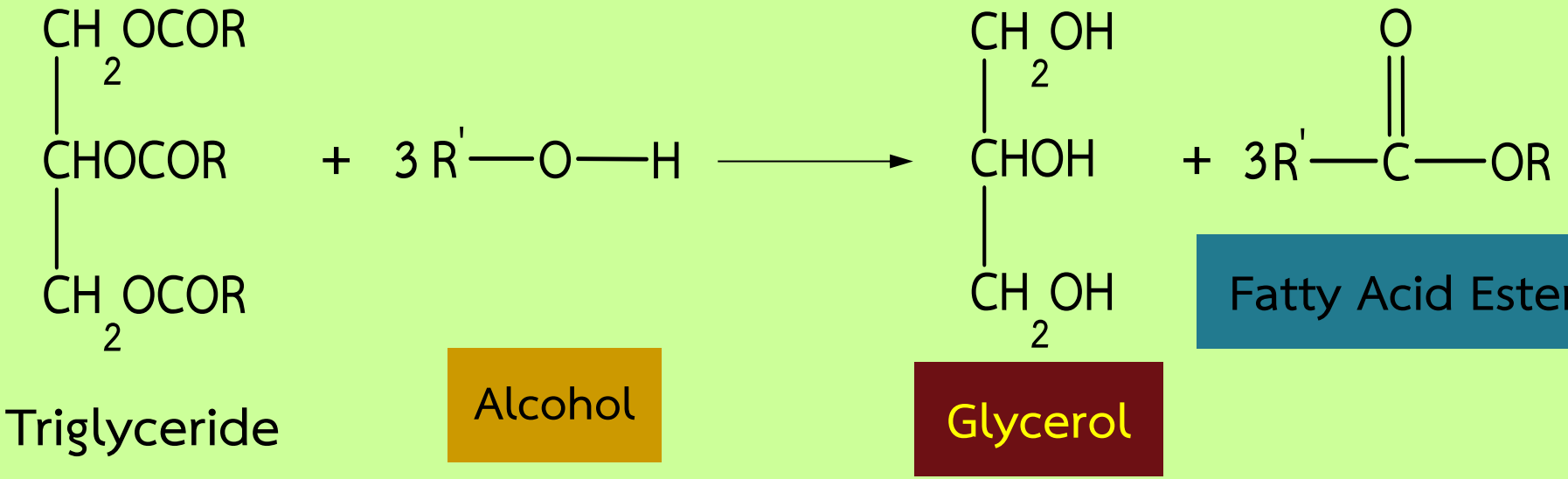
1.Hydrolysis reaction ➡ Decompose



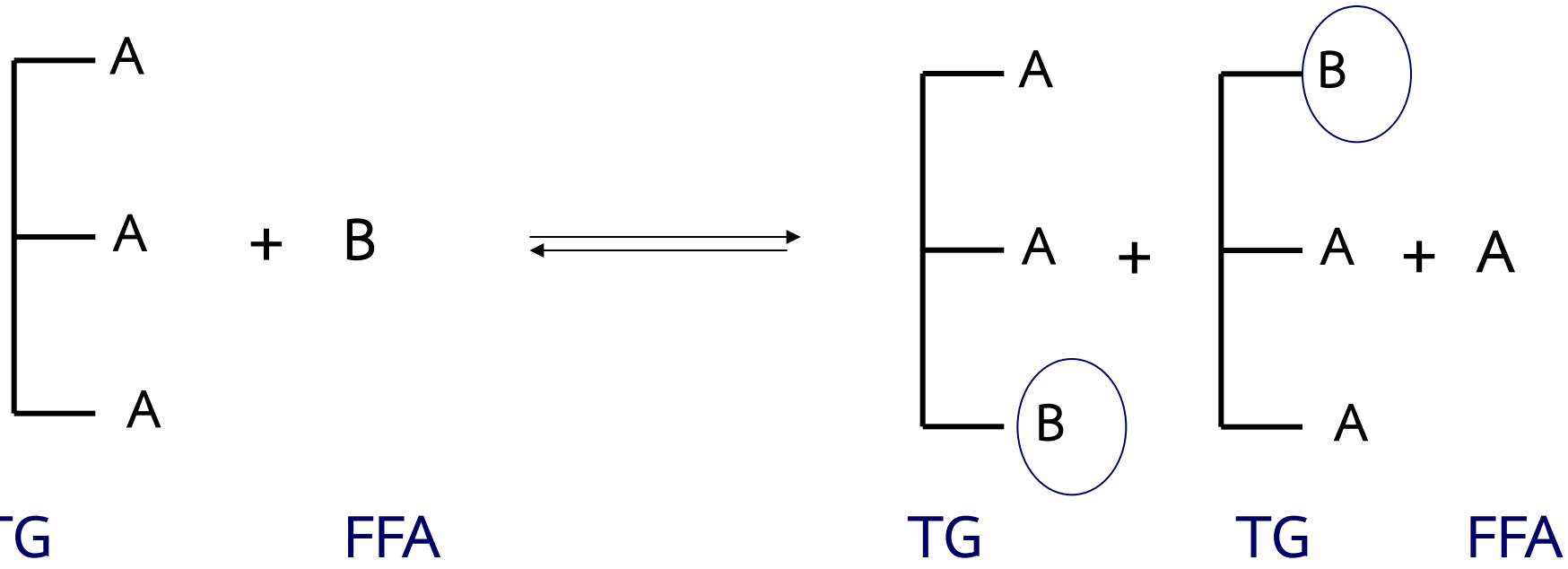
2. Esterification reaction ➡ Synthesis

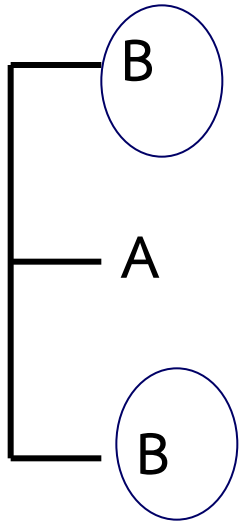


alcoholysis

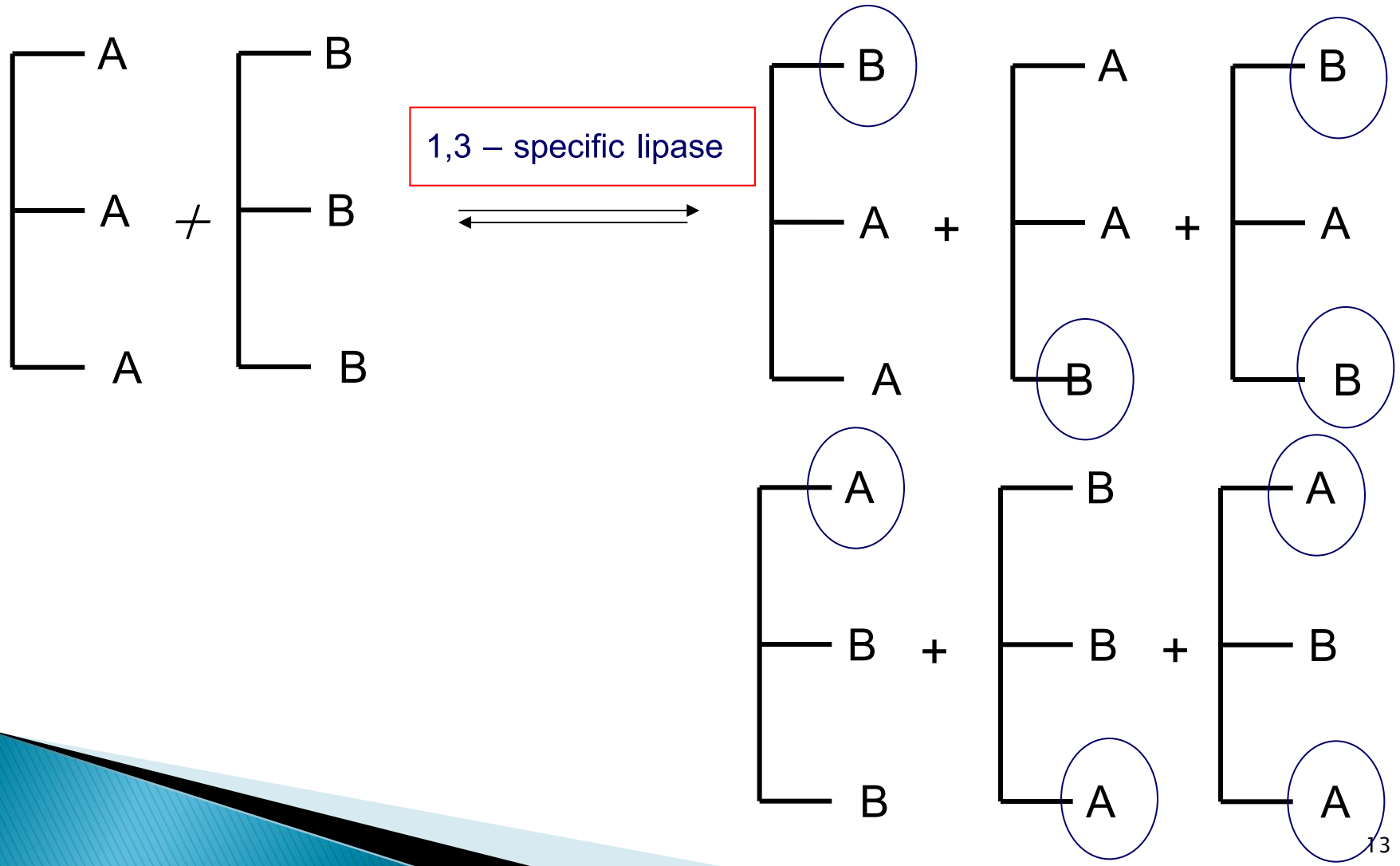


acidolysis





interesterification



เนื่องจาก

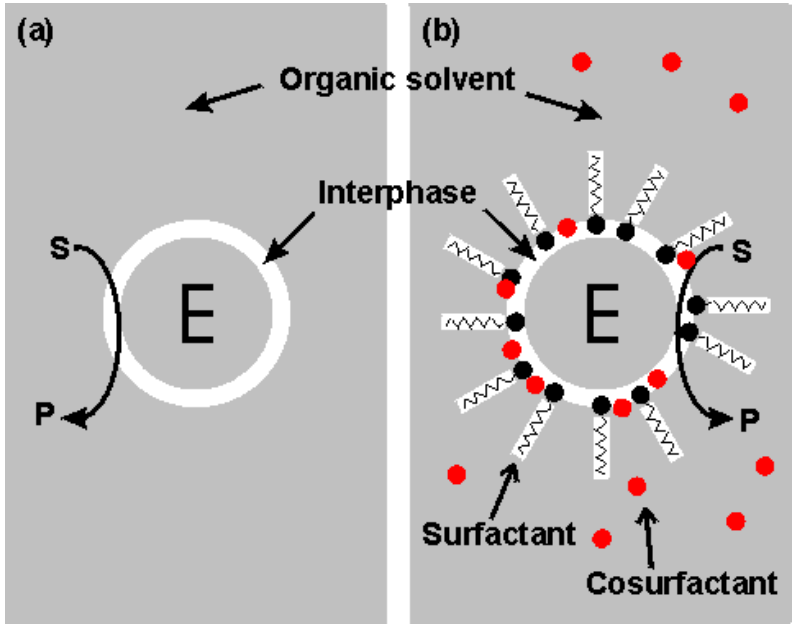
-สับสเตรทไม่ละลายน้ำ

-เอนไซม์ต้องทำงานในตัวกลางที่เป็นน้ำ

- ทำปฏิกิริยาในระบบตัวกลางที่เป็นของเหลวสองชนิดที่ต่างกัน คือ ชนิดหนึ่งเป็นน้ำ และอีกชนิดเป็นของเหลวที่ไม่ใช่น้ำ (aqueous-nonaqueous system)

เอนไซม์ทำงานในตัวทำละลายอินทรีย์

การทำงานของเอนไซม์ทำงานในตัวทำละลายอินทรีย์



โมเลกุลของน้ำเพียงปริมาณเล็กน้อยที่จับโมเลกุลของเอนไซม์ก็เพียงพอสำหรับการรักษาโครงรูปของเอนไซม์ให้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (active conformation state)

ข้อดีการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์

- ทำให้สับสเตรท หรือผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ ละลายได้มากขึ้น สามารถทำปฏิกิริยาได้ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น
- เอนไซม์ไฮโดรเลสหลายชนิดที่หาง่าย ราคาถูก สามารถนำมาใช้เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ได้ เพราะในสภาพที่มีปริมาณน้ำต่ำ สมดุลเทอร์โมไดนามิกส์ของปฏิกิริยาจะเปลี่ยนไปในทิศทางการสังเคราะห์ซึ่งย้อนกลับกับไฮโดรไลซีส เช่น การสังเคราะห์เอสเทอร์และพันธะเปปไทด์

ข้อดีการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์

- การเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงที่ขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำอาจจะลดลง ป้องกันการเกิดไฮโดรไลซีสของสับสเตรท หรือสารผลิตภัณฑ์
- การยังยั้งปฏิกิริยาของสับสเตรท หรือผลิตภัณฑ์จะลดลง
- ใช้การตรึงเอนไซม์แบบง่ายๆ ก็เพียงพอ ไม่จำเป็นต้องตรึงแบบโควาเลนต์ เนื่องจากตัวเอนไซม์เองละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้น้อยมากอยู่แล้ว

ข้อดีการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในตัวทำละลายอินทรีย์

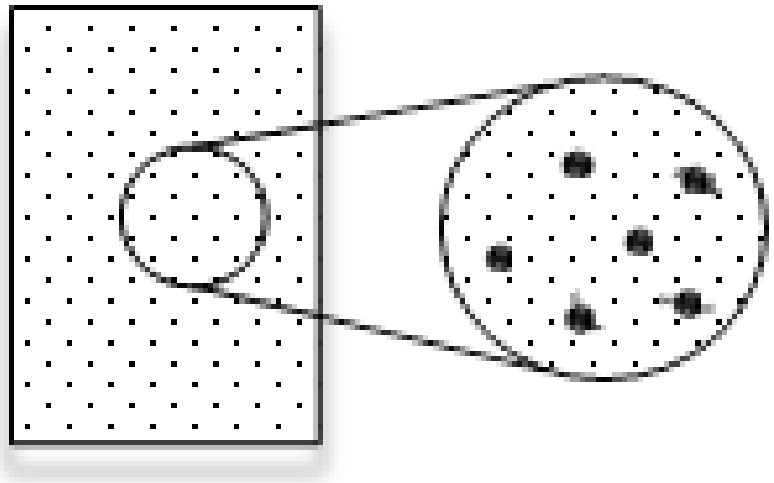
- การใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารอินทรีย์ทำได้ภายในขั้นตอนเดียว (เช่น การสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ยารักษาโรคหรือยาปราบศัตรูพืช) ในขณะที่การสังเคราะห์ทางเคมี ดั้งเดิมต้องใช้ปฏิกิริยาหลายขั้น
- มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์น้อยกว่าการใช้เอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์
- การแยกเก็บผลิตภัณฑ์และเอนไซม์ทำได้ง่ายแม้ว่าเอนไซม์ที่ใช้จะไม่ใช่เอนไซม์ตรึง
- ความเสถียรของเอนไซม์ดีขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อความร้อน
- เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ในสภาพที่มีปริมาณน้ำต่ำอาจจะมี stereoselectivity และ enantioselectivity เพิ่มขึ้น

วิธีการใช้เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

1. water miscible solvent

- เติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถรวมตัวกับน้ำ ลงไปในสารละลายที่เป็นน้ำซึ่งมีเอนไซม์ละลายอยู่ สับสเตรทจะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์

ก

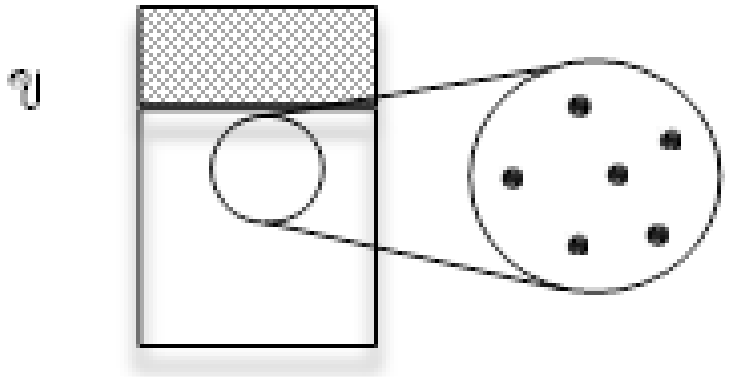


2. Water immiscible solvent

- เกิดระบบสองวัฏภาค (biphasic system)

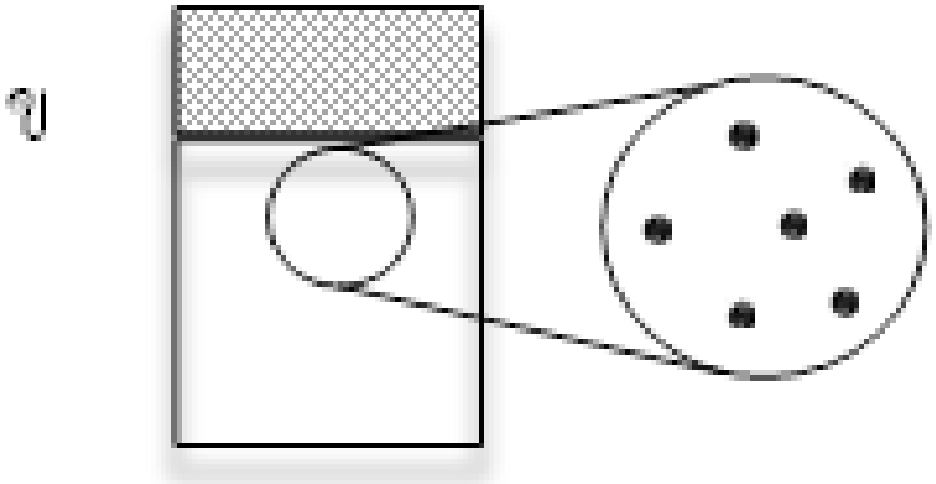
- สับสเตรทละลายอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ และมีสับสเตรทปริมาณน้อยที่ละลายในส่วนที่เป็นน้ำ ซึ่งเป็นที่ที่สับสเตรทจับกับเอนไซม์เพื่อทำให้เกิดผลิตภัณฑ์

- แอคติวิตีของเอนไซม์จะขึ้นกับพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ (interface)



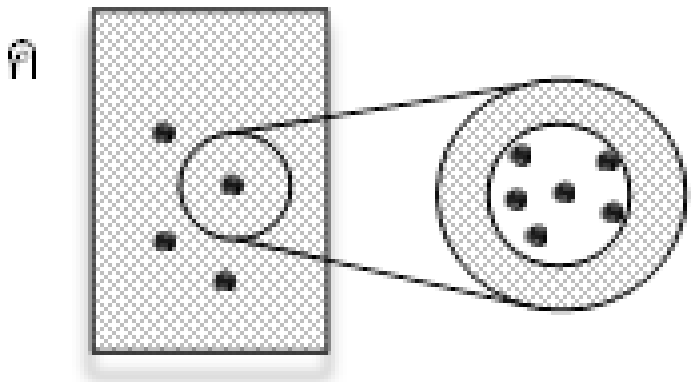
3. ระบบของเหลวสองวัฏภาค

- ระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ
- เอนไซม์อยู่ในรูปเอนไซม์ตรึงแขวนลอยในส่วนน้ำ



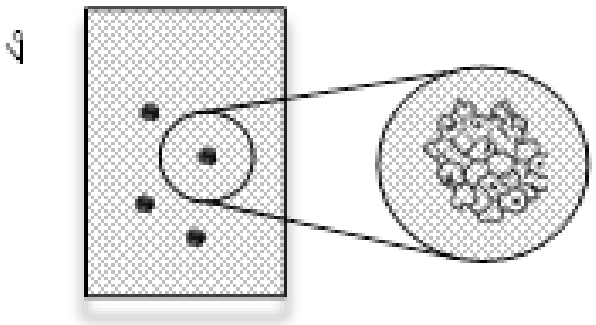
4. ระบบที่เอนไซม์ถูกกักไว้ในพาหะตรึงที่มีรูพรุนซึ่งมีน้ำบรรจุอยู่เต็มและแขวนลอยในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ

- เอนไซม์อยู่ไนสิ่งแวดล้อมที่เป็นน้ำ การใช้เอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ สิ่งที่เจือปนอยู่อาจสร้างสิ่งแวดล้อมรอบโมเลกุลของเอนไซม์ (microenvironment) ซึ่งช่วยป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์



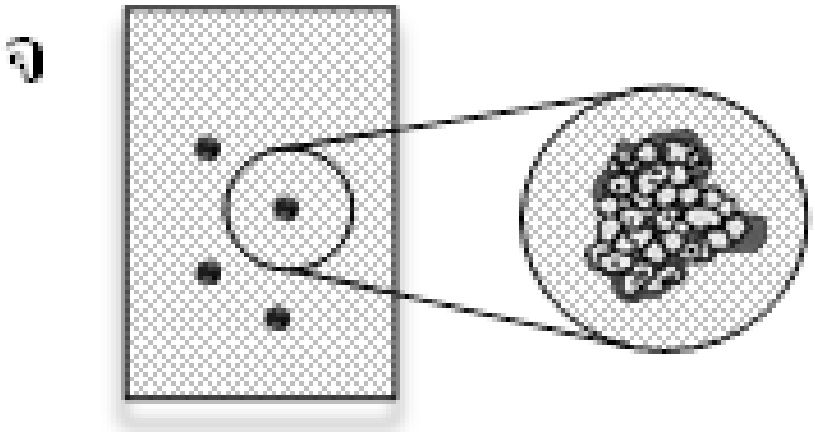
5. วิธีที่มีเอนไซม์ดูดซับบนพาหะตรึงที่มีรูพรุนแล้วทำการระเหยน้ำออก

- จากนั้นเติมตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ



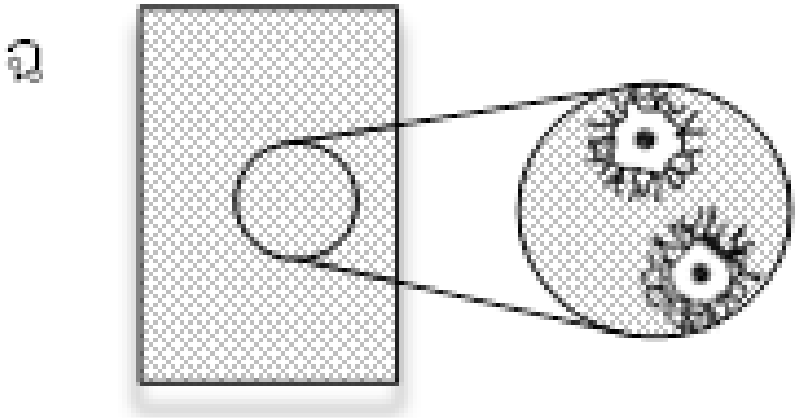
6. วิธีที่มีการเติมเอนไซม์ลงไปโดยตรงในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ

- เอนไซม์อยู่ในรูปสารแขวนลอย
- การแพร่กระจายของเอนไซม์เป็นไปได้ยาก เนื่องจากเอนไซม์ดึงดูดกันด้วยแรงไอออนิคที่แข็งแรงกว่าแรงที่ดึงดูดในตัวทำละลายอินทรีย์



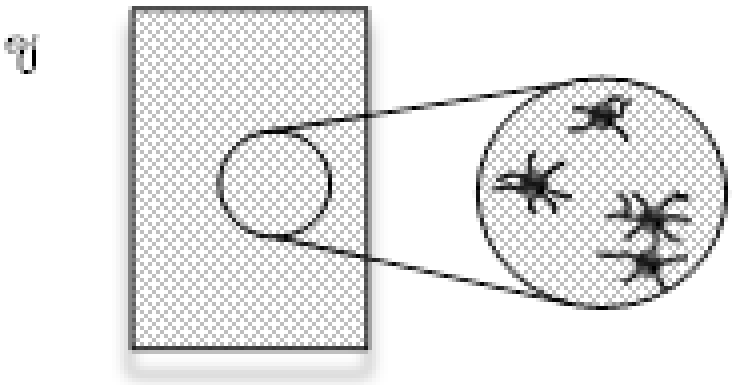
7. วิธีที่เอนไซม์ถูกกักอยู่ใน reversed micelle (water in oil) ที่มีน้ำบรรจุอยู่

- เป็นสารละลายใส ประกอบด้วยน้ำเล็กๆ ที่ถูกทำให้คงตัวด้วยสารลดแรงตึงผิว ซึ่งอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ ส่วนเอนไซม์ละลายในส่วนที่เป็นน้ำ



8. วิธีที่เอนไซม์ถูกเปลี่ยนแปลงให้ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ โดยการจับกับสารบางชนิด

- เช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) ด้วยพันธะโควาเลนท์ และอาศัยลักษณะที่เป็นไฮโดรโฟบิคของสายไฮโดรคาร์บอนช่วยในการละลายในตัวทำละลายอินทรีย์



ปัจจัยหลักที่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

1.น้ำ

- Bound water : เกาะแน่นอยู่กับเอนไซม์สำคัญต่อการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์และจำเป็นสำหรับการเร่งปฏิกิริยา
- Bulk water : ไม่ได้เกาะแน่นอยู่กับเอนไซม์อาจถูกขจัดออกได้โดยไม่ทำให้เอนไซม์สูญเสียประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา

การที่จะวัดปริมาณน้ำที่มีอยู่เพื่อที่จะเข้าใจพฤติกรรมของเอนไซม์นั้นนิยมใช้ Water activity (Aw) : ค่าที่แสดงความชื้นสัมพัทธ์ในวัฏภาคที่เป็นก๊าซ Enz + substrate ควบคุม Aw ได้โดยใส่ในภาชนะปิดควบคุมความชื้น

2. ตัวทำละลายอินทรีย์

-Hydrophilic solvent : รวมตัวเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ ชอบที่จะดึงน้ำรอบๆโมเลกุลเอนไซม์ทำให้เอนไซม์คลี่ออกเป็นสายส่งผลให้มีแอคติวิตีต่ำ เช่น acetonitrile, tetrahydroluran, dioxane, pyridine

- Hydrophobic solvent : ไม่แย่งดึงน้ำออกจากเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีเช่นเดิม เช่น heptane, isooctane, diisopropyl ether, dibutyl ether

ดังนั้นแอคติวิตีในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดไฮโดรโฟบิคจึงสูงกว่าชนิดไฮโดรฟิลิก

3. พาหะและวิธีการตรึงเอนไซม์

- เอนไซม์เมื่อละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ จะมีแรงดึงดูดระหว่างเอนไซม์แข็งแรงกว่าแรงที่ทำให้เอนไซม์แพร่กระจายในตัวทำละลายอินทรีย์
- เอนไซม์จึงไม่ละลายและเกาะเป็นก้อน ทำให้เกิดการต้านการแพร่ของสับสเตรทในการเข้าไปยังบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้แอคติวิตีต่ำ

ตรึงเอนไซม์เพื่อให้เอนไซม์กระจายตัวและป้องกันเอนไซม์จากตัวกลางที่ไม่ใช่น้ำ

ดังนั้นพาหะและวิธีการตรึงจึงมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

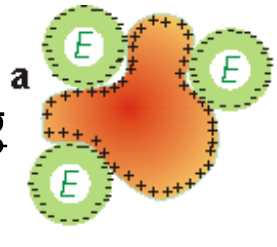
พาหะตรึงเอนไซม์

1. สารอินทรีย์ : มีกลุ่มฟังชันก์จำนวนมากที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของเอนไซม์ง่าย แต่มีข้อเสียคือ ไม่ทนต่อแรงกระทบ ความร้อน สารเคมี และจุลินทรีย์ เอนไซม์ที่ตรึงด้วยพาหะจึงไม่เสถียร

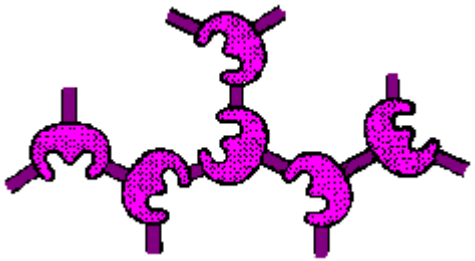
2. สารอนินทรีย์ : มีความเหมาะสมทางด้านการใช้งานด้านอุตสาหกรรม เนื่องจากทนต่อแรงกระทบ ความร้อน สารเคมี ไม่ถูกสลายด้วยจุลินทรีย์ ง่ายต่อการเก็บรักษา อายุการใช้งานนาน

Enzyme immobilization
รูปแบบการตรึงเอนไซม์

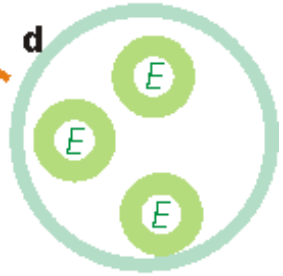
Carrier-binding



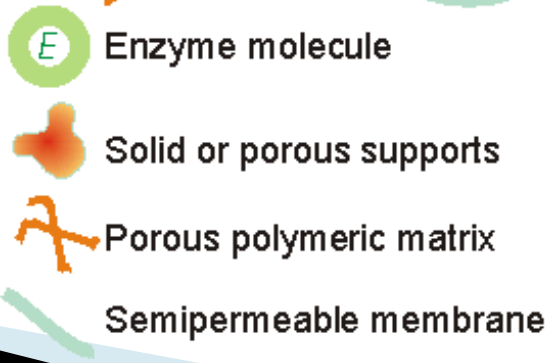
Cross linking



Entrapped in a matrix



Entrapped in droplets



การเปรียบเทียบเอนไซม์ที่ตรึงด้วยวิธีต่างๆ

ข้อเปรียบเทียบ	วิธีการตรึงเอนไซม์				
	Adsorption	Ionic	Covalent	Cross link	Entrapment
วิธีการเตรียม	สะดวก	สะดวก	ยุ่งยาก	ยุ่งยาก	ยุ่งยาก
แรงยึดเหนี่ยว	อ่อน	ปานกลาง	แข็งแรง	แข็งแรง	แข็งแรง
แอคติวิตี	ปานกลาง	สูง	สูง	ปานกลาง	สูง
ต้นทุนการตรึง	ต่ำ	ต่ำ	สูง	สูง	ปานกลาง
ความเสถียร	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	สูง	ปานกลาง
การนำพาหะมาใช้ใหม่	ได้	ได้	ได้น้อย	ไม่ได้	ไม่ได้

เอนไซม์ไลเปสในการสังเคราะห์สารเคมีที่มีมูลค่าสูง

- เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ในสารละลายอินทรีย์ ดังนั้นจึงสามารถใช้เอนไซม์กลุ่มนี้ในการเร่งปฏิกิริยาหลายชนิดที่ใช้ตัวทำละลายอื่นๆ

อุตสาหกรรมโอลิโอเคมี

อุตสาหกรรมการผลิตยาและสารเคมีเพื่อการเกษตร

- เอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์ในสภาพที่มีปริมาณน้ำต่ำจะมี stereoselectivity และ enantioselectivity เพิ่มขึ้น
- ในการผลิตยานาโปรเซน (naproxen) และอิบูโปรเฟน (ibuprofen) สำหรับลดอาการปวด ลดไข้ ลดอาการอักเสบ และอาการแข็งตัวเนื่องจากข้ออักเสบ โรคเก๊าท์ เป็นต้น มักต้องการ S-enantiomer เพื่อประสิทธิภาพสูงสุดในการออกฤทธิ์
- ใช้เอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะเจาะจงต่อ S-enantiomer ของสารผสมเรมิก naproxen ((S)-naproxen) เกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันกับ alcohol (1,4-butane diol) ไปเป็น (S)-naproxen hydroxyalkyl ester การใช้เอนไซม์ไลเปสในการสังเคราะห์ 2-N-morpholino ester (S)-ibuprofen ester จากสารผสมเรซิมิก ibuprofen

เอนไซม์สำหรับกำจัดสารพิษหรือโลหะหนักที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Bioremealation)

- โดยเอมไซม์จะทำการตัดพันธะในสารกระกอบอินทรีย์ หรือเร่งปฏิกิริยา **เปลี่ยนแปลงสารพิษให้มีความเป็นพิษน้อยลง และสามารถย่อยสายทางชีวภาพต่อได้**
- มีการใช้เอนไซม์แลคเคสในการลดความเป็นพิษของสารประกอบ Phenol polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) polychlorinated biphenol (PCBs) สารกำจัดวัชพืชและสีอะโซ
- ใช้ในการย่อยสาร Organophosphates (OPs) ที่ใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชและสารฆ่าแมลง
- สำหรับกำจัดสิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียที่มีแบคทีเรียก่อให้เกิดโรค โดยเอนไซม์จะช่วยย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และยังช่วยย่อยโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในกากตะกอน (sludge)

เอนไซม์สำหรับการผลิตพลังงานสะอาด (Clean energy)

- ไบโอดีเซล (Biodisel)
- ไบโอเทธานอล (Bioethanol)